

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290068

研究課題名(和文)呼吸器再生基盤技術の構築

研究課題名(英文)Development of tissue regeneration technology of respiratory system

研究代表者

栗崎 晃(Kurisasi, Akira)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：60346616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年iPS細胞を始めとする多能性幹細胞を用いた細胞分化技術は、難病の原因究明、創薬応用、再生医療への応用を目指した研究開発に盛んに利用されている。本研究では、呼吸器組織にのみ分化する肺の前駆細胞を、成体の細胞から作製する新たな分化方法を開発している。発生期の肺組織で発現する因子の中から肺前駆細胞を分化させる効果のある因子を特定し、肺前駆細胞マーカーの発現を誘導することを確認した。さらにその前駆細胞様細胞を分化誘導するといくつかの肺上皮細胞の分化マーカーが上昇することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患は、咳や喀痰、息切れなどで慢性呼吸不全を伴う難病である。本疾患には気管支拡張剤や去痰剤の対症療法が施されているが、現在のところ効果的な治療法は存在しない。本研究では肺組織のもととなる肺前駆細胞の新たな作製方法を開発しており、このような難病の新たな治療技術の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Stem cell differentiation technologies using pluripotent stem cells, especially iPS cells, are currently applied for the understanding of intractable diseases, drug discovery, and development of regenerative medicine. In this research, we are developing a novel differentiation method that generates lung progenitor cells in vitro. We have screened novel genes selectively expressed in the developing lung and found several factors that can induce lung progenitor cells. When these generated progenitor-like cells were cultured in a differentiation medium, several lung tissue cell markers were induced in vitro.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 分化 細胞 遺伝子 転写因子

1. 研究開始当初の背景

肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、咳や喀痰、息切れなどで慢性呼吸不全を伴いQOLが著しく低下する難治疾患である。本疾患には気管支拡張剤や去痰剤の対症療法が施されているが、現在のところ根本的な治療法は存在しない。最近、iPS細胞などの多能性幹細胞は、目的組織細胞を分化させて調製することができる有望な幹細胞として応用研究が進んでいる。しかし、肺は多種類の機能性上皮細胞や毛細血管、間質組織などから構成される非常に複雑で精密な臓器であり、これら多様な細胞群を調製して肺組織を再構築するのは容易ではないと考えられる。また、iPS細胞は肺組織細胞以外の様々な細胞へと分化しうる強力な分化能を有しているため、目的外の細胞や未分化なiPS細胞の混入による奇形腫の形成の危険性が考えられることから、高いレベルでの分化制御技術が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、肺組織細胞にのみ分化する前駆細胞を調製する簡便な方法として、成体の細胞から作製する新たな分化方法を開発することを研究目的とした。

3. 研究の方法

肺の前駆細胞を作製するため、筆者らはこれまでにマウス発生期の肺の組織サンプルを材料にしたマイクロアレイ解析とバイオインフォマティクス解析を行い、また論文等で報告されている重要制御因子についても、適宜候補因子としてピックアップして合計13種の遺伝子を用いて肺前駆細胞を作製可能か肺前駆細胞マーカーや上皮細胞マーカーの発現を指標に検討を行ってきた。特に、定量的RT-PCRや免疫染色により様々な遺伝子の組み合わせで検討を行い、比較定量することで分化転換に必要な因子の絞り込みを行

ってきた。その結果、6つの有望因子の絞り込みまで終えていた。本研究では定量的RT-PCRや免疫染色によりさらに必要因子の絞り込みを行った。また、このようにして作製した肺前駆細胞と思われる細胞を分離し、マイクロアレイ解析でその細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。さらに、作製した肺前駆細胞を用いてその分化能力を確認するため、分化培地で培養することで、成熟肺組織へと分化する能力を有するかについて *in vitro* の培養で検証を行った。さらに、免疫不全マウスに移植による *in vivo* 実験により成体内における分化特異性についても検討した。

4. 研究成果

これまでの筆者らの研究から、発生期の肺で発現する6種類の因子を導入することで、上皮細胞様の細胞集団が観察され、定量的RT-PCRにより肺前駆細胞マーカーの発現が上昇することが確認されていた。本研究でさらにこの6つの因子から定量的RT-PCRにより重要因子を絞り込んだところ、5つの因子でも肺前駆細胞マーカー陽性の細胞を作製できることが明らかとなった。また、材料を変えて作製した場合でも、これらの5つの因子で肺前駆細胞様の細胞を作製できることが確認された。また、これらの肺前駆細胞様の細胞を *in vitro* で分化させると粘液分泌細胞マーカーのMuc5acや肺胞上皮I型細胞のAqp5発現が上昇することから、ある程度の分化能があると考えられた。さらに、腎皮膜下に移植したところ、Aqp5陽性の細胞の存在が確認された。次に、作製した肺前駆細胞様の細胞のコロニーをピックアップしてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い他のマウス組織と比較したところ、特に胎児期の肺組織に最も近い遺伝子発現プロファイルを示すことが分かった。現在、ヒトの体細胞を用いて同様に作製が可能か

研究を進めているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

○ Identification of novel proteins differentially expressed in pluripotent embryonic stem cells and differentiated cells. Enomoto K, Watanabe-Susaki K, Kowno M, Takada H, Intoh A, Yamanaka Y, Hirano H, Sugino H, Asashima M, Kurisasi A. J Med Invest. 2015 62(3-4):130-136.

○ Lipase member H frequently overexpressed in human esophageal adenocarcinomas. Ishimine H, Zhou R, Sumitomo K, Ito Y, Seki Y, Yoshida Y, Kurisasi A. Tumour Biol. 2016 37(2):2075-2081.

○ Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. Takada H, Kurisasi A. Cell Mol Life Sci. 2015 72(21):4015-4025.

○ Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells. Noguchi TK, Ninomiya N, Sekine M, Komazaki S, Wang PC, Asashima M, Kurisasi A. Nat Cell Biol. 2015 17(8):984-993.

○ Establishment and culture optimization of a new type of pituitary immortalized cell line. Kokubu Y, Asashima M, Kurisasi A. Biochem Biophys Res Commun. 2015 463(4):1218-1224.

○ Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. Watanabe-Susaki K, Takada H, Enomoto K, Miwata K, Ishimine H, Intoh A, Ohtaka M, Nakanishi M, Sugino H, Asashima M, Kurisasi A. Stem Cells. 2014 32(12):3099-3111.

[学会発表](計 7 件)

○ 栗崎 晃 ミニ胃組織オーガノイドを用いた創薬応用 バイオジャパン 2016 依頼講演(横浜)2016年10月

○ 栗崎 晃、山川哲生、久保陽子、大高真奈美、中西真人 樹立法の違いによるヒト iPS 細胞の品質と分化への影響 第 89 回日本組織培養学会総会 シンポジウム 依頼公演(大阪)2016年5月

○ 栗崎 晃 E S細胞を用いた胃組織の分化誘導 武田薬品工業主催 第 2 回 H Pylori 陰性時代の課題を探る シンポジウム 特別講演(京都)2015年11月28日

○ Takada H, Kida Y, Kurisasi A. Spheroid culture condition optimally expands angiogenic cells of adipose tissue-derived stromal vascular fraction 第 14 回国際幹細胞生物学会 ポスター発表(サンフランシスコ)2016年6月

○ Noguchi TK, Ninomiya N, Wang PC, Asashima M, Kurisasi A. Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells. 第 13 回国際幹細胞生物学会 ポスター発表(ストックホルム)2015年6月

○ Kokubu Y, Noguchi TK, Ito T, Ninomiya N, Asashima M, Kurisasi A. Monitoring of

lung tissue cells differentiated from human pluripotent stem cells by secreted protein. 第 13 回国際幹細胞生物学会 ポスター発表(ストックホルム)2015 年 6 月

○ Kurisaki A. Stem cell regulation and differentiation. Special LICR-IMBIM Tumor Biology Seminar 口頭発表(ウプサラ、スウェーデン)2015 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

〔その他〕

<https://unit.aist.go.jp/brd/jp/groups/scerg/scerg.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗崎 晃 (Akira Kurisaki)

産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号: 60346616

(2) 研究分担者

高田仁実 (Hitomi Takada)

産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究員

研究者番号: 80641068